

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-228783

(43) 公開日 平成8年(1996)9月10日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	F I	
C12N 15/09	ZNA 9162-4B	C12N 15/00	ZNA A
A01H 5/00	ZNA	A01H 5/00	ZNA A
A01M 1/20		A01M 1/20	A
A01N 63/00		A01N 63/00	A
63/02		63/02	E
審査請求 未請求 請求項の数12 F D (全14頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平7-290370

(22) 出願日 平成7年(1995)10月12日

(31) 優先権主張番号 特願平6-276082

(32) 優先日 平6(1994)10月14日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000003986

日産化学工業株式会社

東京都千代田区神田錦町3丁目7番地1

(72) 発明者 飯塚 敏彦

北海道札幌市東区北27条東3丁目1-28-14

(72) 発明者 田川 道人

埼玉県南埼玉郡白岡町大字白岡1470 日産
化学工業株式会社生物科学研究所内

(72) 発明者 荒井 論

埼玉県南埼玉郡白岡町大字白岡1470 日産
化学工業株式会社生物科学研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なバチルス菌株及び有害生物防除剤

(57) 【要約】

【課題】 有害生物防除剤の有効成分となる新規な結晶性蛋白質及び該蛋白質を生産する微生物の提供。

【解決手段】 有害生物防除剤の有効成分となる新規な結晶性蛋白質及び該蛋白質を生産するバチルス・チューリンゲンシス・パー・ジャポネンシスN141株及び該蛋白質をコードする遺伝子の提供。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 バチルス・チューリングエンシス・パー・ジャポネンシスN141株。

【請求項2】 請求項1記載のバチルス・チューリングエンシス・パー・ジャポネンシスN141株により産生された結晶性毒素蛋白質。

【請求項3】 配列番号2に示すアミノ酸配列を有する蛋白質。

【請求項4】 請求項3記載の蛋白質のアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が付加、欠失又は置換されており、且つ殺虫活性を示すアミノ酸配列を有する蛋白質。

【請求項5】 請求項2記載の蛋白質をコードしている塩基配列を含んでなるDNA。

【請求項6】 請求項4記載の蛋白質をコードしている塩基配列を含んでなるDNA。

【請求項7】 配列番号1で示される塩基配列を有するDNA。

【請求項8】 請求項1記載のバチルス・チューリングエンシス・パー・ジャポネンシスN141株及び／又は請求項2記載の蛋白質を含むことを特徴とする有害生物防除剤。

【請求項9】 請求項5記載の遺伝子を用いて形質転換されたことを特徴とする微生物。

【請求項10】 請求項5記載の遺伝子を用いて形質転換されたことを特徴とする植物又はその種子。

【請求項11】 請求項2記載の蛋白質を有害生物に適用することにより、該有害生物により引き起こされる被害から植物を保護する方法。

【請求項12】 請求項11記載の有害生物が鱗翅目又は鞘翅目害虫である植物防除法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、新規なバチルス・チューリングエンシス・パー・ジャポネンシスN141

(*Bacillus thuringiensis* var. *japonensis* N141、以下N141と略記することもある) 株及び殺虫性結晶蛋白質をコードする遺伝子並びに殺虫性結晶蛋白質及び該蛋白質を有効成分として含有することを特徴とする有害生物防除剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 バチルス・チューリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*、以下Btと略記する) 並びにBtの産生する結晶性毒素蛋白質は、環境を汚染しない微生物農薬 (Bt剤) として、特に鱗翅目害虫に対する殺虫剤として非常に有用であり、実際に世界各国で使用されている。

【0003】 Btは、グラム陽性の桿状菌で対数増殖末期の胞子形成期に結晶蛋白質を産生する。この結晶蛋白質は、昆虫が経口的に消化管内に取り入れたとき、消化

液中でアルカリ分解、酵素分解を受けてはじめて腸管麻痺並びに全身麻痺を伴う殺虫活性を示す蛋白質となるが、哺乳類に対しては毒性を示さない。Btの産生する結晶蛋白質は、一般にダイヤモンド型 (diamond-shaped)、重ピラミッド型 (bipyramidal)、偏菱形立方体 (rhombohedral) 等と呼ばれる形態をしている。結晶蛋白質は、芽胞のう内で、芽胞とならんで形成され、芽胞のうの時期を経て芽胞とともに菌体外に遊離する (Hannay, C. L.; *Nature* 172(1004) 1953)。

【0004】 Btの分類は、De Barjac and Bonefoi (*Entomophaga* 7(5-31) 1962) の提案による鞭毛抗原 (H-antigen) に基づいて行なわれており、今までに数多くの亜種が見い出されている。

【0005】 これら菌株の殺虫活性は亜種によって異なっており、極めて特異性の高いものとなっている。例えば、鱗翅目昆虫に活性を示す亜種としてクルスタキ (*ku rustaki*)、アイザワイ (*aizawai*) 等が、又鞘翅目昆虫に活性を示す亜種としてテネブリオニス (*tenebrionis*)、ジャポネンシスブイブイ (*japonensis buibui*) 等が知られている。

【0006】 しかし実際には、同じ亜種でも菌株ごとに殺虫活性スペクトラムは異なっており、一部の鱗翅目害虫に活性を示すBt株では害虫の抵抗性が生じている。又、鞘翅目昆虫に有効な活性を示す菌株の報告も少ない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 よって、Bt剤に抵抗性の生じた鱗翅目害虫に対しても効果のある新規なBt剤が求められている。更に、鞘翅目昆虫に対して活性を有するBt剤に対する需要がある。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、鱗翅目、鞘翅目の昆虫に対し優れた殺虫活性を有する結晶性蛋白質を生産する、新規な菌株を見だし、本発明を完成させた。

【0009】 本発明は通商産業省工業技術院生命工学技術研究所に受託番号FERM P-14576; FERM BP-5241として寄託されたバチルス・チューリングエンシス・パー・ジャポネンシスN141 (*Bacillus thuringiensis* var. *japonensis* N141) 株に関する。

【0010】 本発明の別の要旨に於ては、N141によって産生された殺虫性結晶蛋白質 (以下N141結晶蛋白質と略記する) を主成分として含有することを特徴とする有害生物防除剤が提供されるものであり、更に害虫の被害から植物を保護する方法であって該害虫をN141結晶蛋白質に接触させることからなる害虫の被害から植物を保護する方法が提供されるものである。

【0011】 本発明の新規菌株N141は、一般に用いられている耐熱性の胞子を形成するバチルス属細菌の分

10

20

30

40

50

離方法を用いて分離した。即ち、埼玉県内で採取した土壌の懸濁液に 50～90℃熱処理を加え、標準的平板培地、例えば NB 平板培地を用いて単離した。

【0012】[本発明の新規菌株 N141 の特性]

集落形態・・・・・・不規則縁を有する不透明白色のコロニーを形成する。

増殖期の細胞形態・・・・B t に典型的。

鞭毛の血清型・・・・23、ジャポネンシス (japonensis)。

細胞内含有物・・・・胞子形成細胞は不定型結晶蛋白質 10
を作る。結晶蛋白質の電子顕微鏡写真を図 1 に示した。

アルカリ可溶性蛋白・・・・本菌株は、130、000 ダルトン付近に泳動される蛋白質を持っている。

活性・・・・・・本菌株は試験された鱗翅目、鞘翅目害虫を殺虫した。

遺伝子・・・・・・本菌株の産生する約 130、000 ダルトンの結晶蛋白質をモルモットに免疫して得られた抗体を用いてスクリーニングを行ない、N141 結晶蛋白質をコードする遺伝子 (以下 N141 遺伝子と略記する) をクローニングした。得られた遺伝子は、3、7 20
59 塩基を有し、47～3、556 の翻訳領域を含む。更に、公知の鞘翅目昆虫に活性を示すジャポネンシスブイブイ (japonensis buibui) 遺伝子 (特開平 6-65292) との比較の結果、図 2 に示した様

に両遺伝子は、アミノ酸配列で約 60% の相同性しか有し ていなかった。

【0013】以上のような事実から、本発明の N141 は、新規菌株と判断し、本発明を完成するに至った。

【0014】

【発明の実施の形態】

【0015】N141 株は、標準的な既知培地と発酵手段を用いて培養できる。即ち、培地は、炭素源としては、例えば、蔗糖、麦芽糖、グルコース、フラクトース、糖蜜、可溶性デンプン等が利用できる。

【0016】窒素源としては、例えば、硫酸アンモニウ

ム、塩化アンモニウム、綿実粉、酵母エキス、大豆粉、カゼイン水解物等が挙げられる。又、ミネラル及びビタミンは、糖蜜、酵母エキス等の有機炭素源及び窒素源で代用することができ、必要に応じては、無機塩類、ビタミン類等を更に添加しても良い。pH は、5～8 が好ましく、培養温度は、好ましくは 25～30℃、培養日数は 2～5 日が良い。培養方法は、好気的条件下での通気攪拌培養が好ましい。

【0017】培養終了後、培養液から殺虫性結晶蛋白質部分を分離採取する場合、通常の遠心分離法、濾過法等を利用する。

【0018】N141 株及び／又は N141 結晶蛋白質を、鞘翅目昆虫及び鱗翅目昆虫を制御するために用いられる有害生物防除剤中の活性成分として用い得る。しかし、特に結晶性蛋白を前記の細菌から分離せずに、結晶毒素含有成分として用いることもできる。

【0019】得られた結晶毒素含有成分を有害生物防除剤として使用するに当たっては、一般に適当な担体、例えばタルク、カオリン等の天然の鉱物繊維や、軽石、ベントナイト、珪藻土等の固体担体或いは水等のような液体担体と混用して適用することができ、所望により乳化剤、分散剤、懸濁剤、浸透剤、展着剤、安定剤等を添加し、水和剤、粉剤、粒剤、フロアブル剤等任意の剤型として実用に供することができる。

【0020】又、必要に応じて製剤時又は散布時に、結晶性毒素活性を阻害しない範囲に於いて他種の除草剤、各種殺虫剤、殺菌剤、植物生長調節剤、共力剤、誘引剤、植物栄養剤、肥料等と混合使用することもできる。

【0021】本発明の結晶毒素含有成分の施用薬量は適用場面、施用時期、施用方法、対象病虫害、栽培作物等により差異はあるが、一般には有効成分組成として、通常、0.1～99%、好ましくは 0.5～50% 程度が適当である。

【0022】次に、本発明の各種製剤の配合割合及び種類の例を下記に記載する。

有効成分	担 体	界 面 活性剤	その他の成分 (補助剤)
水和剤	1～70	15～93	3～10
粉 剤	0.01～30	67～99.5	0～3
粒 剤 (ベイト剤)	0.01～30	67～99.5	0～8
フロアブル剤	1～70	10～90	1～20

上記の表中の数値は、重量%を示す。

【0023】施用に際しては、水和剤及びフロアブル剤では所定量の水で希釈して散布し、粉剤及び粒剤は水で希釈することなく、そのまま直接散布する。次に、上記の各製剤中の各成分の例を挙げる。

【0024】[水和剤]

有効成分 : 本発明の結晶毒素含有物

担 体 : 炭酸カルシウム、カオリン、ジークライト D、ジークライト PEP、珪藻土、タルク

界面活性剤 : ソルボール、リグニンスルホン酸カルシウム、ルノックス

5

その他の成分：カーブックス#80

【0025】〔粉剤〕

有効成分：本発明の結晶毒素含有物

担体：炭酸カルシウム、カオリナイト、ジークライトD、珪藻土、タルク

その他の成分：ジイソプロピルホスフェート、カーブックス#80

【0026】〔粒剤 ペイト剤〕

有効成分：本発明の結晶毒素含有物

担体：小麦粉、フスマ、コーン・グリット、ジークライトD

その他の成分：パラフィン、大豆油

製剤例1 水和剤

本発明の結晶毒素含有物 25部

ジークライトPEP 66部

(カオリナイトとセリサイトの混合物：ジークライト工業(株)商品名)

ソルポール5039 4部

(アニオン性界面活性剤：東邦化学工業(株)商品名)

カーブックス#80 3部

(ホワイトカーボン：塩野義製薬(株)商品名)

リグニンスルホン酸カルシウム 2部

以上を均一に混合粉砕して水和剤とする。

タール当たり0.1~5kgになるように散布する。

【0030】使用に際しては、上記水和剤を500~2

【0031】

000倍に希釈して本発明の結晶毒素含有成分量がヘク

製剤例2 粉剤

本発明の結晶毒素含有物 3.0部

クレー 95部

燐酸ジイソプロピル 1.5部

カーブックス#80 0.5部

(ホワイトカーボン：塩野義製薬(株)商品名)

以上を均一に混合粉砕して粉剤とする。使用に際して

ル当たり0.1~5kgになるように散布する。

は、上記粉剤を本発明の結晶毒素含有成分量がヘクター

【0032】

製剤例3 フロアブル剤

本発明の結晶毒素含有物 35部

ルノックス1000C 0.5部

(陰イオン界面活性剤：東邦化学工業(株)商品名)

ソルポール3353 10部

(非イオン性界面活性剤：東邦化学工業(株)商品名)

1%ザンタンガム水溶液 20部

(天然高分子)

水 34.5部

本発明の結晶毒素含有成分を除く上記の成分を均一に溶解し、次いで本発明の結晶毒素含有物を加えて良く攪拌した後、サンドミルにて湿式粉砕してフロアブル剤を得る。使用に際しては、上記フロアブル剤を50~2000倍に希釈して本発明の結晶毒素含有成分量がヘクター当たり0.1~5kgになるように散布する。

【0033】本発明の鱗翅目・鞘翅目害虫による虫害から植物を保護する方法は、一般に害虫が蔓延した植物に又は蔓延しそうな植物を水のような希釈剤で希釈した上

50

【0027】〔フロアブル剤〕

有効成分：本発明の結晶毒素含有物

担体：水

界面活性剤：ソルポール、リグニンスルホン酸ソーダ、ルノックス、ニッポール

その他の成分：エチレングリコール、プロピレングリコール

【0028】次に、本発明の結晶毒素含有物を有効成分とする有害生物防除剤の製剤例を示すが、本発明はこれらに限定されるものではない。尚、以下の製剤例に於いて、「部」は重量部を意味する。

【0029】

記の有害生物防除剤組成物で処理する(例えば噴霧することによって行う。該防除剤の有効成分は有毒性の δ -菌体内毒素である。所望ならば、該防除剤は有毒性の δ -菌体内毒素を産生する細菌から独立して、植物に又は蔓延する害虫に施用することが出来る。しかし、前記の細菌から結晶性蛋白を分離することは一般に必要ではない。

【0034】本発明の方法で撲滅し得る害虫は鱗翅目(Lepidoptera)害虫及び鞘翅目(Coleoptera)害虫が

挙げられる。

【0035】鱗翅目害虫としては、例えばハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*)、シロイチモジヨトウ (*Spodoptera exigua*) 等のヨトウガ (*Mamestra brassicae*) 類、コナガ (*Plutella xylostella*)、コブノメイガ (*Cnaphalocrocis medinalis*)、ニカメイガ (*Chilo suppressalis*)、イチモンジセセリ (*Parnara guttata*)、モンシロチョウ (*Pieris rapae crucivora*)、イラガ (*Mamestra flavescentis*) 及びキアゲハ (*Papilio machaon hippocrates*) 等が挙げられる。

【0036】鞘翅目害虫としては、例えばドウガネブイブイ (*Anomala cuprea*)、チビサクラコガネ (*Anomala schonfeldti*)、ヒメコガネ (*Anomala rufocuprea*)、アカビロウドコガネ (*Maladera castanea*)、コイチャコガネ (*Adoretus tenuimaculatus*)、マメコガネ (*Popillia japonica*) 等のコガネムシ類、ニジュウヤホシテントウ (*Epilachna vigintioctopunctata*)、オオニジュウヤホシテントウ (*Epilachna vigintioctomaculata*) 等のテントウムシ類、イネミズゾウムシ (*Lissorhoptrus oryzophilus*)、サビヒョウタンゾウムシ (*Scepticus griseus*)、アリモドキゾウムシ (*Cylas formicarius*)、シバオサゾウムシ (*Sphenophorus venatus vestitus*)、コクゾウムシ (*Sitophilus zeamais*) 等のゾウムシ類、キスジノミハムシ (*Phyllotreta striolata*)、ウリハムシ (*Aulacophora femoralis*) 等のハムシ類、オキナワカンシャクシコメツキ (*Melanotus okinawaensis*) 等のコメツキムシ類、マツノマダラカミキリ (*Monochamus alternatus*)、ゴマフカミキリ (*Mesosa myops*) 等のカミキリムシ類、ニホンキクイムシ (*Scolytus japonicus*)、ハンノキキクイムシ (*Xylosandrus germanus*) 等のキクイムシ類、及びチャイロコメノゴミムシ (*Tenebrio molitor*)、コクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*) 等のゴミムシ類が挙げられる。

【0037】本発明の方法は鱗翅目・鞘翅目害虫が蔓延し易い広範囲の植物を保護するのに使用することが出来る。本発明の方法で保護される植物は具体例に挙げた、カンラン等に代表される野菜類の他、カリフラワー等の果菜類、柑橘・落葉果樹、イネ、小麦、豆類等の穀類、貯穀、貯蔵食品、ゴルフ場、庭園等における芝生、茶、サトウキビ等の特用作物、及び花樹である。又、植林地及び公園等の非農耕地の樹木等や森林の樹木等が挙げられる。

【0038】N141遺伝子は、N141株から単離し得る。1つ又はそれ以上の制限酵素を用いてN141株の全DNAを消化後、産生されたDNA断片を2〜5KbpのDNA画分にサイズ分画し、このような画分を好適なベクターに連結し、大腸菌を形質転換し得る。次に、N141株の結晶蛋白質に対する抗体を用いたエンザイムイムノアッセイ法により、大腸菌の形質転換体を

から目的遺伝子を保持した大腸菌形質転換体を確認し得る。

【0039】上記のような過程を経て確認されたN141由来の結晶蛋白質遺伝子DNAを、好適な制限酵素で処理し、得られたDNA断片を好適なクローニングベクターに連結し、遺伝子カセットを作製し得る。

【0040】該遺伝子カセットを用いて微生物を形質転換することができる。例えば、大腸菌を形質転換し、ダイデオキシ法等の遺伝子解析法などにより、N141結晶蛋白質の塩基配列を得ることができる。

【0041】更に、該遺伝子カセットを用いて殺虫活性を有するグラム陽性細菌、たとえばBtを形質転換することもできる。それにより、より広範囲の昆虫を制御するのに有効な形質転換Btを産生し得る。

【0042】植物中でN141遺伝子を発現させるために、好適制限部位を導入し、各遺伝子又は遺伝子部分の側面に位置させる。これは、特定部位の突然変異誘発により実施し得る。

【0043】N141株の殺虫的有効部分をコードするN141遺伝子部分は、単一な植物細胞の核ゲノム中に安定に挿入され、そのようにして形質転換された細胞を用いて、昆虫耐性である形質転換植物を作り得る。

【0044】その結果生じた形質転換植物を用いて、同一の特徴を有する形質転換された植物を生産し得るし、あるいは同一又は関連の植物種の他の変種に殺虫剂的に有効なN141遺伝子部分を導入し得る。形質転換植物から得られる種子は、安定したゲノム挿入物として殺虫剂的に有効なN141遺伝子部分を含有する。

【0045】N141株はさらに、1つ又はそれ以上の殺虫活性を持った外来Bt遺伝子で形質転換される。それにより、より広範囲の害虫をも駆除するのに有用な形質転換N141株が産生される。

【0046】N141結晶蛋白質を用いて、モルモットに対し免疫し、この結晶蛋白質に特異的な抗体を調製し得る。

【0047】

【作用】保護領域、即ちN141株及び/又はN141結晶蛋白質を適用した領域で、数種類の昆虫がN141株及び/又はN141結晶蛋白質又はそれらの混合物、あるいはN141伝子を導入した形質転換体(植物、微生物等)を食し、その結果昆虫は、N141結晶蛋白質の影響で死亡するか、損傷を受ける。

【0048】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づいて詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0049】すなわち下記のものも本発明に用いることができる。

【0050】(1) 配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が付加、欠失又は置換されており、且つ殺虫活性を示す蛋白質。

10

20

30

40

50

(2) N141株の産生する結晶性蛋白質をコードしている塩基配列を含んでなるDNA。

(3) 上記(1)記載の蛋白質をコードしている塩基配列を含んでなるDNA。

【0051】実施例1：N141株の単離、性状
埼玉県内で採取した土壌からN141株を単離した。

【0052】試料土壌10mgを三角フラスコに入れ10mLの滅菌水を注入し30分間振盪した後、暫時静置した。その上澄み液2mLをとり直ちに80℃で10分間加熱した。加熱液は10倍、100倍の2段階希釈し、各々1mLをNB平板培地(NUTRIENT BROTH 8.4g、アガー20g/滅菌水1L)上で、30℃、24～48時間培養した。

【0053】〔本発明の新規菌株N141の特性〕
集落形態・・・不規則縁を有する不透明白色のコロニーを形成する。

増殖期の細胞形態・・・Btに典型的。

鞭毛の血清型・・・23、ジャポネンシス(japonensis)。

細胞内含物・・・孢子形成細胞は不定型結晶蛋白質を作る。結晶蛋白質の電子顕微鏡写真を図1に示した。
アルカリ可溶性蛋白・・・本菌株は、130、000ダルトン付近に泳動される蛋白質を持っている。

活性・・・本菌株は試験された鱗翅目、鞘翅目害虫を殺虫した。

遺伝子・・・本菌株の産生する約130、000ダルトンの結晶蛋白質をモルモットに免疫して得られた抗体を用いてスクリーニングを行ない、N141結晶蛋白質をコードする遺伝子(以下N141遺伝子と略記する)をクローニングした。得られた遺伝子は、3、759塩基を有し、47～3、556の翻訳領域を含む。更に、公知の鞘翅目昆虫に活性を示すジャポネンシスブイブイ(japonensis buibui)遺伝子(特開平6-65292)との比較の結果、図2に示した様

に両遺伝子は、アミノ酸配列で約60%の相同性しか有していなかった。

【0054】実施例2：N141株の保存、滅菌
N141株を長期保存するには、N141をNB液体培地(NUTRIENT BROTH 8.4g/滅菌水1L)を用い、30℃で24～72時間、150～200rpmで回転振盪培養後、該培養液と30%グリセロールを等量ずつ混合し、これを-80℃で保存するか、もしくは、該培養液を遠心分離し、得られた菌体を保護液(スキムミルク10%、グルタミン酸ナトリウム1%)に懸濁後、真空乾燥し、保存するのが望ましい。

【0055】N141株の滅菌は、120℃、20分間オートクレーブ処理して実施する。

【0056】実施例3：N141株結晶蛋白質の精製
N141株を一金耳とり、5mLのNB液体培地(NUTRIENT BROTH 8.4g/滅菌水1L)を

含んだ試験管に植菌し、30℃で12～24時間往復振盪培養を行い種培養液を得た。種培養液を終濃度1%となるように100mLのNB液体培地(NUTRIENT BROTH 8.4g/滅菌水1L)を含んだ500mL容三角フラスコに植菌し、30℃で72～96時間、150～200rpmで回転振盪培養を行った。次いで、細胞、孢子及び結晶蛋白質を遠心分離によって回収した。得られた沈殿に適量の緩衝液(Tris-HCl、NaCl、EDTA)を加え超音波破碎を行い、懸濁液を得た。

【0057】実施例4：N141株結晶蛋白質の特性
実施例3で得られた懸濁液を8%SDS-PAGEゲル電気泳動にかけ泳動パターンを調べた。また、抗体を用いてウエスタンブロッティングもおこなった。その結果、N141株の産生する分子量約130、000ダルトンの結晶蛋白質の存在が明らかになった。

【0058】実施例5：N141株のドウガネブイブイ(Anomala cuprea)に対する殺虫活性
実施例3で調製した懸濁液を所定濃度に希釈し、展着剤を添加した試料溶液を、予め滅菌処理しておいた腐葉土に混和し、ドウガネブイブイ(Anomala cuprea)を放虫し、観察した。その結果、ドウガネブイブイ(Anomala cuprea)に対する殺虫活性を確認した。

【0059】実施例6：N141株及びN141結晶蛋白質のコナガ(Plutella xylostella)に対する殺虫活性
実施例3で調製した懸濁液を所定濃度に希釈し、展着剤を添加した試料溶液中にカンランの葉を浸し、その後十分に風乾し、湿った濾紙を入れたスチロールカップに入れた。この中に、3齢中期のコナガ(Plutella xylostella)幼虫を放虫し、6日後の幼虫の死虫率を下記の計算式から求めた。尚、試験は5連1区5頭制で行った。

【0060】

死虫率(%) = (死虫数/放虫数) × 100

【0061】結果を表1に示した。

表1：N141株及びN141結晶蛋白質のコナガ(Plutella xylostella) 3齢中期幼虫に対する殺虫活性。

【0062】

濃度 (ppm)	死虫率 (%)
10000	100
3000	100
1000	100
100	50

【0063】実施例7：N141株及びN141結晶蛋白質のカイコガ(Bombyx mori)に対する殺虫活性
実施例3で調製した懸濁液を所定濃度に希釈し、展着剤を添加した試料溶液中にクワの葉を浸し、その後十分に風乾し、湿った濾紙を入れたスチロールカップに入れ

た。この中に、3齢2日目のカイコガ (*Bombyx mori*) 幼虫放虫し、6日後の幼虫の死虫率を下記の計算式から求めた。尚、試験は5連1区5頭制で行った。

【0064】

死虫率 (%) = (死虫数 / 放虫数) × 100

【0065】結果を表2に示した。

表2: N141株及びN141結晶蛋白質のカイコガ (*Bombyx mori*) 3齢2日目幼虫に対する殺虫活性。

【0066】

濃度 (ppm)	死虫率 (%)
3000	100
1000	95
100	50

【0067】実施例8: N141遺伝子の単離

N141株から得られる全DNAを調製し、制限酵素EcoRIで部分的に消化した。消化DNAより約2~5 KbpのDNA断片を分画し、EcoRI消化したファージベクター (λ gt11) に連結し、その後大腸菌を形質転換した。次に、組み換え大腸菌クローンを、N141株結晶蛋白質と考えられる約130 kDaの蛋白質をモルモットに免疫して得られた抗体を用いて抗体スクリーニングして、N141遺伝子を含有するクローンを確認した。この組み換え大腸菌クローンからDNAを調製し、制限酵素EcoRIで消化した。消化DNA断片を0.8%アガロースゲルで電気泳動することにより約3.4 Kbpの挿入DNA断片を確認した。

【0068】実施例9: N141遺伝子のクローニング
実施例8で得られたDNA断片を分画し、EcoRI消化したプラスミドベクターであるBluescript II SK (-) に連結し、遺伝子カセット (pBN141) を作成した (図3)。pBN141は、完全長ではなかったため、再度クローニングを行い、ダイデオキシ法によりN141完全長遺伝子を含有するDNA断片のDNA塩基配列を決定した。

【0069】実施例10: N141遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列

塩基配列は、配列番号1記載のように3759塩基よりなる。このうちオープンリーディングフレーム (ORF) は第47塩基目から第3556塩基目の3510塩基であり、1169アミノ酸 (1170番目は終止コドン) をコードしている。又、本N141のアミノ酸配列と公知の鞘翅目昆虫に活性を示すジャポネンシスブイブイ (*japonensis buibui*) 遺伝子由来アミノ酸 (特開平6-65292) とのN-末端から662番目までの配列比較の結果、図2に示した様に両遺伝子は、アミノ酸レベルで約60%の相同性しか有していなかった。

【0070】実施例11: 大腸菌 (*E. coli*: DH

5α) でのN141結晶蛋白質の発現

N141遺伝子を用い結晶蛋白質を生産させるために、実施例9での作製した遺伝子カセット (pBN141) を用い大腸菌 (*E. coli*: DH5α) を形質転換し、組み換え大腸菌 (後文では*E. coli*: DH5α (pBN141) と記載する) を得た。該組み換え大腸菌を、LB-amp液体培地 (Trypton 10g, NaCl 10g, Yeast extract 5g, Glucose 0.2%, Ampicillin 50mg / 滅菌水 1L) を用いて37℃で約3時間培養した後、終濃度1mMとなるようにIPTGを添加し、さらに37℃で20時間培養した。培養終了後、培養液を遠心分離し、沈殿にLysis bufferを4倍量 (W/V) 添加し、室温で10間懸濁し、次いでLysosomeを終濃度1mg/mLになるよう添加し、混和後10分間氷上で静置した。さらに、Triton X-100を終濃度1%になるように添加し、混和後、室温で10分間静置した。次いで、遠心分離し、上清部分を回収した。

【0071】実施例12: *E. coli*: DH5α (pBN141) 発現蛋白の特性

実施例11で得られた上清を、8%SDS-PAGEゲル電気泳動にかけ泳動パターンを調べた。また、抗体を用いてウエスタンブロッティングもおこなった。その結果、*E. coli*: DH5α (pBN141) がN141結晶蛋白質を生産していることが確認された。

【0072】実施例13: *E. coli*: DH5α (pBN141) 発現蛋白のコナガ (*Plutella xylostella*) 幼虫に対する殺虫活性

実施例11から得られた上清溶液に、展着剤を添加した試料溶液の希釈液中にカンランの葉を浸し、その後十分に風乾し、湿った濾紙を入れたスチロールカップに入れた。この中に、3齢中期のコナガ (*Plutella xylostella*) 幼虫を放虫し、6日後の幼虫の死虫率を下記の計算式から求めた。尚、試験は5連1区5頭制で行った。

【0073】

死虫率 (%) = (死虫数 / 放虫数) × 100

【0074】結果を表3に示した。

表3: *E. coli*: DH5α (pBN141) 発現蛋白質のコナガ (*Plutella xylostella*) 3齢中期幼虫に対する殺虫活性

【0075】

濃度 (ppm)	死虫率 (%)
200	85
100	50

【0076】実施例14: *E. coli*: DH5α (pBN141) 発現蛋白質のカイコガ (*Bombyx mori*) 幼虫に対する殺虫活性

実施例 11 から得られた、上清溶液に展着剤を添加した試料溶液の希釈液中にクワの葉を浸し、その後十分に風乾し、湿った濾紙を入れたスチロールカップに入れた。この中に、3 齢 2 日目のカイコガ (*Bombyx mori*) 幼虫を放虫し、6 日後の幼虫の死虫率を下記の計算式から求めた。尚、試験は 5 連 1 区 5 頭制で行った。

【0077】

死虫率 (%) = (死虫数 / 放虫数) × 100

【0078】結果を表 4 に示した。

表 4 : *E. coli* : DH5α (pBN141) 発現蛋白質のカイコガ (*Bombyx mori*) 3 齢 2 日目幼虫に対する殺虫活性

【0079】

濃度 (ppm)	死虫率 (%)
200	70

【0080】

配列

```

TTTTAAATAC ATTGGAGTGT AATAGACTGG TATTGGAGGA ACAAGTATGA ATCGAAATAA 60
TCAAAATGAA TATGAAGTTA TTGATGCCCC ACATTGTGGG TGTCGGCAG ATGATGTTGT 120
AAAATATCCT TTGACAGATG ATCCGAATGC TGGATTGCAA AATATGAACT ATAAGGAATA 180
TTTACAAACG TATGGTGGAG ACTATACAGA TCCTCTTATT AATCCTAACT TATCTGTTAG 240
TGGAAAAGAT GTAATACAAG TTGGAATTAA TATTGTAGGG AGATTACTAA GCTTTTTTGG 300
ATTTCCCTTT TCTAGTCAAT GGGTTACTGT ATATACCTAT CTTTTAAACA GCTTGTGGCC 360
GGATGACGAG AATTCTGTAT GGGACGCTTT TATGGAGAGA GTAGAAGAAC TTATTGATCA 420
AAAAATCTCA GAAGCAGTAA AGGGTAGGGC ATTGGATGAC CTAAGTGGAT TACAATATAA 480
TTATAATTTA TATGTAGAAG CATTAGATGA GTGGCTGAAT AGACCAAATG GCGCAAGGGC 540
ATCCTTAGTT TCTCAGCGAT TTAACATTTT AGATAGCCTA TTTACACAAT TTATGCCAAG 600
CTTTGGCTCT GGTCTGGAA GTCAAAATTA TGCAACTATA TTAAGTCCAG TATATGCACA 660
AGCAGCAAAC CTTCATTTGT TATTATTAAG AGATGCAGAC ATTTATGGAG CTAGATGGGG 720
GCTGAATCAA ACTCAAATAG ATCAATTCCA TTCTCGTCAA CAAAGCCTTA CTCAGACTTA 780
TACAAATCAT TGTGTTACTG CGTATAATGA TGGATTAGCG GAATTAAGAG GCACAACCGC 840
TGAGAGTTGG TTAAATACA ATCAATATCG TAGAGAAATG ACTTTGACGG CAATGGATTT 900
AGTGGCATTG TTCCCATATT ATAATTTACG ACAATATCCA GATGGGACAA ATCCTCAACT 960
TACACGTGAG GTCTATACAG ATCCGATTGC ATTTGATCCA CTGGAACAAC CAACTACTCA 1020
ATTATGTCGA TCATGGTACA TTAACCCAGC TTTTCGAAAT CATTGGAATT TCTCTGTACT 1080
AGAAAATTCA TTGATTCGTC CCCCACACT TTTTGAAAGG TTAAGTAATT TGCAAATTTT 1140
AGTTAATTAC CAAACAAACG GTAGCGCTTG GCGTGGGTCA AGGGTAAGAT ACCATTATTT 1200
GCATAGTTCT ATAATACAGG AAAAAAGTTA CGGCCTCCTC AGTGATCCCG TTGGAGCTAA 1260
TATCAATGTT CAAAATAATG ATATTTATCA GATTATTTTC CAGGTTAGCA ATTTTGCTAG 1320
TCCTGTTGGC TCATCATATA GTGTTTGGGA CACTAACTTT TATTGAGTT CAGGACAAGT 1380
AAGTGGGATT TCAGGATATA CACAGCAAGG TATACCAGCA GTTGTCTTTC AACACGAAA 1440
TTCAACTGAT GAGTTACCAA GCTTAAATCC GGAAGGAGAT ATCATTAGAA ATTATAGTCA 1500
TAGGTTATCT CATATAACCC AATATCGTTT TCAAGCAACT CAAAGTGGTA GTCCATCAAC 1560
TGTTAGCGCA AATTACCTA CTGTGTATG GACGCATCGA GATGTGGACC TTGATAATAC 1620
CATTACTGCG AATCAAATTA CACAACCTACC ATTAGTAAAG GCATATGAGC TAAGTAGTGG 1680
TGCTACTGTC GTGAAAGGTC CAGGATTCAC AGGAGGAGAT GTAATCCGAA GAACAAATAC 1740
TGGTGGATTC GGAGCAATAA GGGTGTCCGT CACTGGACCG CTAACACAAC GATATCCGAT 1800

```

【発明の効果】本発明の N141 結晶蛋白質は、鱗翅目昆虫のみでなく鞘翅目昆虫例えばドウガネブイブイ (*Anomala cuprea*) に対しても活性を有することから、殺虫剤組成物としての有用性が期待される。

【0081】

【配列表】

配列番号 : 1

配列の長さ : 3759

配列の型 : 核酸

起源

生物名 : パチルス・チューリングエンシス・パー・ジャポネンシス (*Bacillusthuringiensis* var. *japonensis*)

株名 : N141

15
 AAGGTTCCGT TATGCTTCGA CAATAGATTT TGATTTCCTT GTAACACGTG GAGGAACTAC 1860
 TATAAATAAT TTTAGATTTA CACGTACAAT GAACAGGGA CAGGAATCAA GATATGAATC 1920
 CTATCGTACT GTAGACTTTA CAACTCCTTT TAACTTTACA CAAAGTCAAG ATATAATTCC 1980
 AACATCTATC CAGGGACTTA GTGGAATGG GGAAGTATAC CTTGATAGAA TTGAAATCAT 2040
 CCCTGTGAAC CCGGCACGAG AAGCAGAAGA GGATTTAGAA GCAGCGAAGA AAGCGGCTAG 2100
 GCAGAACTTG TTTACACGTA CAAGGACGG ATTACAGGTA AATGTGACAG ATTATCAAGT 2160
 GGACCAAGCG GCAAATTTAG TGTCTGCTT ATCCGATGAA CAATATGGG ATGACAAAAA 2220
 GATGTTATTG GAAGCGGTAA GAGCGGCAA ACGCCTCAGC CGCGAACGCA ACTTACTTCA 2280
 AGATCCAGAT TTTAATACAA TCAATAGTAC AGAAGAGAAT GGCTGGAAG CAAGTAACGG 2340
 TGTACTATT AGCGAGGGCG GTCCATTCTT TAAAGGTCGT GCACTTCAGT TAGCAAGCGC 2400
 AAGAGAAAAT TATCCAACAT ACATTTATCA AAAAGTAGAT GCATCGGTGT TAAAGCCTTA 2460
 TACACGCTAT AGACTGGATG GGTTCGTGAA GAGTAGTCAA GATTTAGAAA TTGATCTCAT 2520
 TCACTATCAT AAAGTCCATC TTGTGAAAA TGTACCAGAT AATTTAGTAT CCGATACTTA 2580
 CTCGGATGGT TCTTGCACTG GAATGAATCG ATGTGAGGAA CAACAGATGG TAAATGCCGA 2640
 ACTGGAAACA GAACATCATC ATCCGATGGA TTGCTGTGAA GCGGCTCAA CACATGAGTT 2700
 TTCTTCTAT ATTAATACAG GGGATCTAAA TGCAAGTGTA GATCAGGGCA TTTGGGTGT 2760
 ATTAAGAGT CGAACAACAG ATGGGTATGC GACGTTAGGA AATCTTGAAT TGGTAGAGGT 2820
 TGGGCCATTA TCGGCTGAAT CTCTAGAACG GGAACAAAGA GATAATCCGA AATGGAATGC 2880
 AGAGCTAGGA AGAAAACGTG CAGAAATAGA TCCTGTGTAT TTAGCTCGCA AACAAGCAAT 2940
 TAATCATCTG TTTGTAGACT ATCAAGATCA ACAATTAAAT CCAGAAATTG GGCTAGCAGA 3000
 AATTAATGAA GCTTCAAATC TTGTAGAGTC AATTTCCGGT GTATATAGTG ATACACTATT 3060
 ACAGATTCCT GGGATTAAC ACGAAATTTA CACAGACTTA TCCGATCGCT TACAACAAGC 3120
 ATCGTATCTG TATACGCTC GAAATCGGT GCAAAATGGA GACTTTAACA GTGGTCTAGA 3180
 TAGTTGGAAT ACAACTACGG ATGCATCGGT TCAGCAAGAT GGCAATATGC ATTTCTTAGT 3240
 TCTTTCCGAT TGGGATGCAC AAGTTTCTCA ACAATTGAGA GTAAATCCGA ATTGTAAGTA 3300
 TGTCTTACGT GTGACAGCAA GAAAAGTAGG AGGCGGAGAT GGATACGTCA CAATCCGAGA 3360
 TGGCGCTCAT CACCAAGAAA CTCTTACATT TAATGCATGT GACTACGATG TAAATGGTAC 3420
 GTATGTCAAT GACAATTCTG ATATAACAGA AGAAGTGGTA TTCTACCCAG AGACAAAACA 3480
 TATGTGGGTA GAGGTGAGTG AATCCGAAGG TTCATTCTAT ATAGACAGTA TTGAGTTTAT 3540
 TGAACACAAA GAGTAGAAGA GGGGATCCT AACGTATAGC AACTATGAGA GGATACTCCG 3600
 TACAAACAAA GATTAAAAA AGGTAAAAAT AATAGAACCC CCTACTGGTA GAAGGTCTGG 3660
 TAGGGGGTTC TTACATGAAA AAATGTAGCT GTTTACTAAG GTATATAAAA AACAGCATAT 3720
 TTGATAGAAA AAAATGAGTA CTTATAAAG AAAGAATTC 3759

【0082】配列番号：2

配列の型：アミノ酸

配列の長さ：1169

配列

Met	Asn	Arg	Asn	Asn	Gln	Asn	Glu	Tyr	Glu	Val	Ile	Asp	Ala	Pro
			5						10					15
His	Cys	Gly	Cys	Pro	Ala	Asp	Asp	Val	Val	Lys	Tyr	Pro	Leu	Thr
			20						25					30
Asp	Asp	Pro	Asn	Ala	Gly	Leu	Gln	Asn	Met	Asn	Tyr	Lys	Glu	Tyr
			35						40					45
Leu	Gln	Thr	Tyr	Gly	Gly	Asp	Tyr	Thr	Asp	Pro	Leu	Ile	Asn	Pro
			50						55					60
Asn	Leu	Ser	Val	Ser	Gly	Lys	Asp	Val	Ile	Gln	Val	Gly	Ile	Asn
			65						70					75
Ile	Val	Gly	Arg	Leu	Leu	Ser	Phe	Phe	Gly	Phe	Pro	Phe	Ser	Ser
			80						85					90
Gln	Trp	Val	Thr	Val	Tyr	Thr	Tyr	Leu	Leu	Asn	Ser	Leu	Trp	Pro
			95						100					105

17

18

Asp Asp Glu Asn Ser Val Trp Asp Ala Phe Met Glu Arg Val Glu		
110	115	120
Glu Leu Ile Asp Gln Lys Ile Ser Glu Ala Val Lys Gly Arg Ala		
125	130	135
Leu Asp Asp Leu Thr Gly Leu Gln Tyr Asn Tyr Asn Leu Tyr Val		
140	145	150
Glu Ala Leu Asp Glu Trp Leu Asn Arg Pro Asn Gly Ala Arg Ala		
155	160	165
Ser Leu Val Ser Gln Arg Phe Asn Ile Leu Asp Ser Leu Phe Thr		
170	175	180
Gln Phe Met Pro Ser Phe Gly Ser Gly Pro Gly Ser Gln Asn Tyr		
185	190	195
Ala Thr Ile Leu Leu Pro Val Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His		
200	205	210
Leu Leu Leu Leu Lys Asp Ala Asp Ile Tyr Gly Ala Arg Trp Gly		
215	220	225
Leu Asn Gln Thr Gln Ile Asp Gln Phe His Ser Arg Gln Gln Ser		
230	235	240
Leu Thr Gln Thr Tyr Thr Asn His Cys Val Thr Ala Tyr Asn Asp		
245	250	255
Gly Leu Ala Glu Leu Arg Gly Thr Thr Ala Glu Ser Trp Phe Lys		
260	265	270
Tyr Asn Gln Tyr Arg Arg Glu Met Thr Leu Thr Ala Met Asp Leu		
275	280	285
Val Ala Leu Phe Pro Tyr Tyr Asn Leu Arg Gln Tyr Pro Asp Gly		
290	295	300
Thr Asn Pro Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Ile Ala		
305	310	315
Phe Asp Pro Leu Glu Gln Pro Thr Thr Gln Leu Cys Arg Ser Trp		
320	325	330
Tyr Ile Asn Pro Ala Phe Arg Asn His Leu Asn Phe Ser Val Leu		
335	340	345
Glu Asn Ser Leu Ile Arg Pro Pro His Leu Phe Glu Arg Leu Ser		
350	355	360
Asn Leu Gln Ile Leu Val Asn Tyr Gln Thr Asn Gly Ser Ala Trp		
365	370	375
Arg Gly Ser Arg Val Arg Tyr His Tyr Leu His Ser Ser Ile Ile		
380	385	390
Gln Glu Lys Ser Tyr Gly Leu Leu Ser Asp Pro Val Gly Ala Asn		
395	400	405
Ile Asn Val Gln Asn Asn Asp Ile Tyr Gln Ile Ile Ser Gln Val		
410	415	420
Ser Asn Phe Ala Ser Pro Val Gly Ser Ser Tyr Ser Val Trp Asp		
425	430	435
Thr Asn Phe Tyr Leu Ser Ser Gly Gln Val Ser Gly Ile Ser Gly		
440	445	450
Tyr Thr Gln Gln Gly Ile Pro Ala Val Cys Leu Gln Gln Arg Asn		
455	460	465
Ser Thr Asp Glu Leu Pro Ser Leu Asn Pro Glu Gly Asp Ile Ile		
470	475	480

Arg Asn Tyr Ser His Arg Leu Ser His Ile Thr Gln Tyr Arg Phe		
485	490	495
Gln Ala Thr Gln Ser Gly Ser Pro Ser Thr Val Ser Ala Asn Leu		
500	505	510
Pro Thr Cys Val Trp Thr His Arg Asp Val Asp Leu Asp Asn Thr		
515	520	525
Ile Thr Ala Asn Gln Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Tyr		
530	535	540
Glu Leu Ser Ser Gly Ala Thr Val Val Lys Gly Pro Gly Phe Thr		
545	550	555
Gly Gly Asp Val Ile Arg Arg Thr Asn Thr Gly Gly Phe Gly Ala		
560	565	570
Ile Arg Val Ser Val Thr Gly Pro Leu Thr Gln Arg Tyr Arg Ile		
575	580	585
Arg Phe Arg Tyr Ala Ser Thr Ile Asp Phe Asp Phe Phe Val Thr		
590	595	600
Arg Gly Gly Thr Thr Ile Asn Asn Phe Arg Phe Thr Arg Thr Met		
605	610	615
Asn Arg Gly Gln Glu Ser Arg Tyr Glu Ser Tyr Arg Thr Val Glu		
620	625	630
Phe Thr Thr Pro Phe Asn Phe Thr Gln Ser Gln Asp Ile Ile Arg		
635	640	645
Thr Ser Ile Gln Gly Leu Ser Gly Asn Gly Glu Val Tyr Leu Asp		
650	655	660
Arg Ile Glu Ile Ile Pro Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu		
665	670	675
Asp Leu Glu Ala Ala Lys Lys Ala Ala Arg Gln Asn Leu Phe Thr		
680	685	690
Arg Thr Arg Asp Gly Leu Gln Val Asn Val Thr Asp Tyr Gln Val		
695	700	705
Asp Gln Ala Ala Asn Leu Val Ser Cys Leu Ser Asp Glu Gln Tyr		
710	715	720
Gly His Asp Lys Lys Met Leu Leu Glu Ala Val Arg Ala Ala Lys		
725	730	735
Arg Leu Ser Arg Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asp Phe Asn		
740	745	750
Thr Ile Asn Ser Thr Glu Glu Asn Gly Trp Lys Ala Ser Asn Gly		
755	760	765
Val Thr Ile Ser Glu Gly Gly Pro Phe Phe Lys Gly Arg Ala Leu		
770	775	780
Gln Leu Ala Ser Ala Arg Glu Asn Tyr Pro Thr Tyr Ile Tyr Gln		
785	790	795
Lys Val Asp Ala Ser Val Leu Lys Pro Tyr Thr Arg Tyr Arg Leu		
800	805	810
Asp Gly Phe Val Lys Ser Ser Gln Asp Leu Glu Ile Asp Leu Ile		
815	820	825
His Tyr His Lys Val His Leu Val Lys Asn Val Pro Asp Asn Leu		
830	835	840
Val Ser Asp Thr Tyr Ser Asp Gly Ser Cys Ser Gly Met Asn Arg		
845	850	855

21

22

Cys Glu Glu Gln Gln Met Val Asn Ala Gln Leu Glu Thr Glu His		
860	865	870
His His Pro Met Asp Cys Cys Glu Ala Ala Gln Thr His Glu Phe		
875	880	885
Ser Ser Tyr Ile Asn Thr Gly Asp Leu Asn Ala Ser Val Asp Gln		
890	895	900
Gly Ile Trp Val Val Leu Lys Val Arg Thr Thr Asp Gly Tyr Ala		
905	910	915
Thr Leu Gly Asn Leu Glu Leu Val Glu Val Gly Pro Leu Ser Gly		
920	925	930
Glu Ser Leu Glu Arg Glu Gln Arg Asp Asn Ala Lys Trp Asn Ala		
935	940	945
Glu Leu Gly Arg Lys Arg Ala Glu Ile Asp Arg Val Tyr Leu Ala		
950	955	960
Ala Lys Gln Ala Ile Asn His Leu Phe Val Asp Tyr Gln Asp Gln		
965	970	975
Gln Leu Asn Pro Glu Ile Gly Leu Ala Glu Ile Asn Glu Ala Ser		
980	985	990
Asn Leu Val Glu Ser Ile Ser Gly Val Tyr Ser Asp Thr Leu Leu		
995	1000	1005
Gln Ile Pro Gly Ile Asn Tyr Glu Ile Tyr Thr Glu Leu Ser Asp		
1010	1015	1020
Arg Leu Gln Gln Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Ser Arg Asn Ala Val		
1025	1030	1035
Gln Asn Gly Asp Phe Asn Ser Gly Leu Asp Ser Trp Asn Thr Thr		
1040	1045	1050
Thr Asp Ala Ser Val Gln Gln Asp Gly Asn Met His Phe Leu Val		
1055	1060	1065
Leu Ser His Trp Asp Ala Gln Val Ser Gln Gln Leu Arg Val Asn		
1070	1075	1080
Phe Asn Cys Lys Tyr Val Leu Arg Val Thr Ala Arg Lys Val Gly		
1085	1090	1095
Gly Gly Asp Gly Tyr Val Thr Ile Arg Asp Gly Ala His His Gln		
1100	1105	1110
Glu Thr Leu Thr Phe Asn Ala Cys Asp Tyr Asp Tyr Asn Gly Thr		
1115	1120	1125
Tyr Val Asn Asp Asn Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Val Val Phe Tyr		
1130	1135	1140
Pro Glu Thr Lys His Met Trp Val Glu Val Ser Glu Ser Glu Gly		
1145	1150	1155
Ser Phe Tyr Ile Asp Ser Ile Glu Phe Ile Glu Thr Gln Glu		
1160	1165	1169

【図面の簡単な説明】

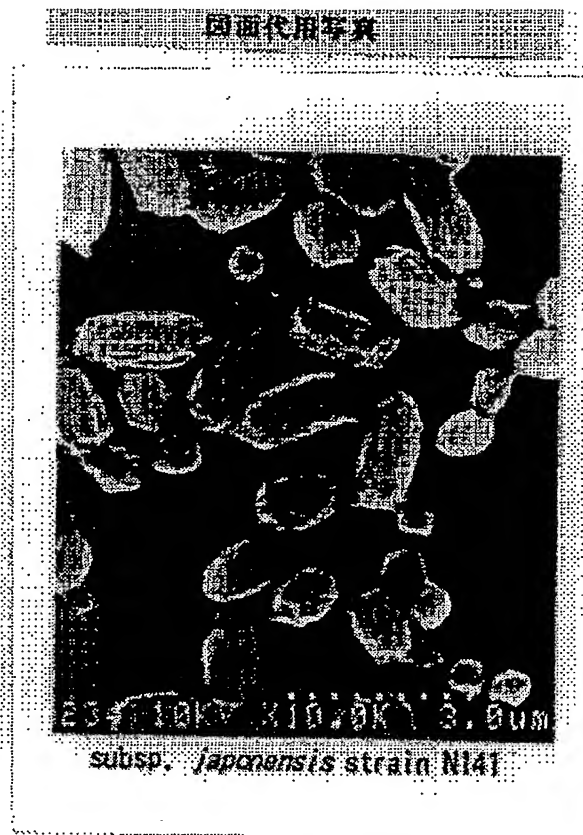
【図1】パチルス・チューリングゲンシス・バー・ジャポネンシスN141株の電子顕微鏡写真である。

【図2】パチルス・チューリングゲンシス・バー・ジャポネンシスN141遺伝子とパチルス・チューリングゲンシ

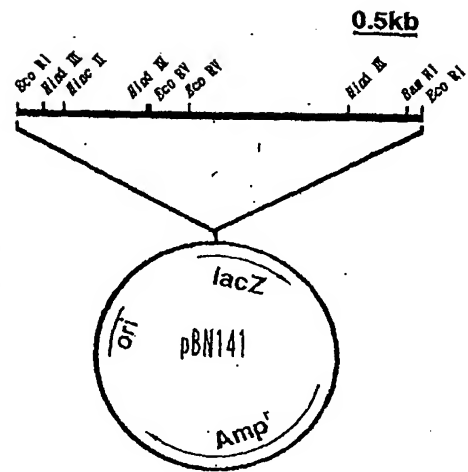
ス・ブイブイ遺伝子各々に対応するアミノ酸配列との相同性をN-末端から662番目のアミノ酸配列を比較した図である。

【図3】パチルス・チューリングゲンシス・バー・ジャポネンシスN141遺伝子とベクターの連結図である。

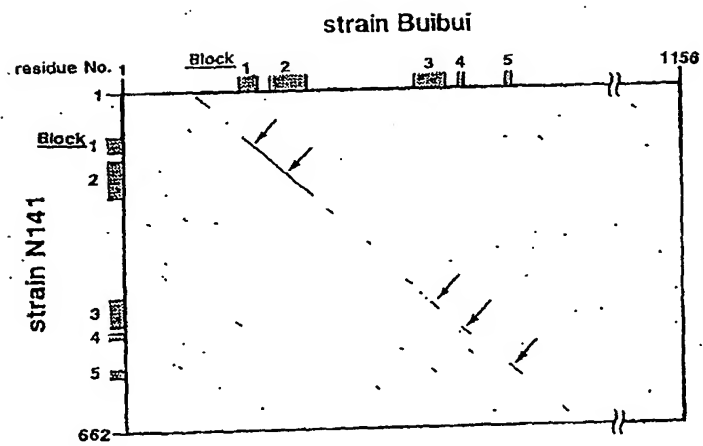
【図1】



【図3】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. °	識別記号	F I	
C07H 21/04		C07H 21/04	B
C07K 14/325	8517-4H	C07K 14/325	
C12N 1/20	8828-4B	C12N 1/20	A
	8828-4B		E
1/21	8828-4B	1/21	
// C12P 21/02		C12P 21/02	C
(C12N 1/20			
C12R 1:07)			
(C12N 1/21			
C12R 1:19)			
(C12P 21/02			
C12R 1:19)			

(72) 発明者 三宅 敏郎
 埼玉県南埼玉郡白岡町大字白岡1470 日産
 化学工業株式会社生物科学研究所内

(72) 発明者 新関 昌統
 埼玉県南埼玉郡白岡町大字白岡1470 日産
 化学工業株式会社生物科学研究所内